



Expressão, purificação e caracterização da relação estrutura/função da proteína Tah1 de Sorgo, uma planta de importância biotecnológica.

Gustavo H. Martins*, Natália G. Quel, Carlos H. I. Ramos.

Resumo

Formado pelas proteínas Rvb1, Rvb2, Pih1 e Tah1, o complexo R2TP está envolvido em muitos mecanismos celulares, tais como remodelamento da cromatina, maturação da RNA polimerase II, montagem e translocação do complexo C/D SnoRNP, etc. Muitas dessas funções ocorrem pela associação do complexo R2TP com a chaperona Hsp90, a qual interage com a proteína Tah1. Para melhor compreender os componentes do sistema chaperona e sua relação com demais processos celulares - especialmente as funções do complexo R2TP -, este trabalho tem como proposta o estudo estrutural e funcional da proteína Tah1 de Sorgo, reforçando que até então se tem conhecimento desse sistema somente em animais e acrescentando que Sorgo é uma planta com alto potencial alimentício e bioenergético.

Palavras-chave:

Chaperonas, R2TP, Tah1.

Introdução

Proteínas são biomoléculas que desempenham importantes funções fisiológicas e, para que isso aconteça de maneira eficiente, é necessário que elas se encontrem devidamente enoveladas de modo a adquirirem sua estabilidade estrutural e funcional. Porém o interior celular é um ambiente muito concentrado em macromoléculas, o que pode ser um fator limitante para o processo de enovelamento. Diante disso, a célula pode recorrer às proteínas do sistema chaperona devido ao fato delas possuírem capacidade de auxiliar outros polipeptídeos a adquirirem sua forma nativa, o que demonstra sua importância na contribuição para a homeostase proteica¹.

Hsp90 é uma das integrantes da família das chaperonas moleculares. Muitas de suas funções podem ser ampliadas devido a sua interação com proteínas auxiliares, as quais são denominadas de co-chaperonas. A associação da Hsp90 com o complexo proteico R2TP exemplifica este fato e coloca a co-chaperona Tah1 em enfoque no presente trabalho, uma vez que se observa a sua capacidade de interagir com a Hsp90². Portanto, temos aqui como objetivo a expressão, purificação e caracterização do estado conformacional e estabilidade térmica da proteína Tah1 por meio de espectroscopia de dicroísmo circular, bem como a avaliação do ambiente químico de seus resíduos de aminoácidos aromáticos por espectroscopia de emissão de fluorescência.

Resultados e Discussão

Através de células bacterianas da linhagem BL21 (DE3) de *E. coli*, Tah1 foi expressa em fração solúvel. Posteriormente à expressão e a lise física e química das células, Tah1 foi obtida com alto grau de pureza através de cromatografias de afinidade ao metal e exclusão molecular. A caracterização da estrutura secundária de Tah1 bem como sua estabilidade térmica foram determinadas através de espectroscopia de dicroísmo circular, da qual se obteve espectros indicando Tah1 como sendo composta majoritariamente por hélice α (53 %), mantendo-se estável até 50 °C e com valor de Tm de 65 °C. Quanto à avaliação do ambiente químico dos resíduos aromáticos, os espectros de emissão de fluorescência de Tah1 em condições nativas e desnaturantes demonstraram que pelo menos um de

seus resíduos de triptofano se encontra enterrado no interior da proteína.

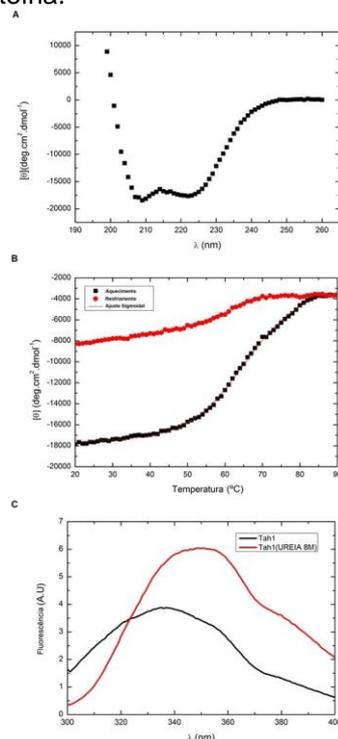


Figura 1. (A) espectro de dicroísmo circular de Tah1 com mínimos de sinal em 222 nm e 208 nm; (B) desenovelamento térmico acompanhado por dicroísmo circular; (C) espectro de fluorescência de Tah1 em condições nativas e desnaturantes.

Conclusões

Tah1 foi produzida enovelada e estável nas condições testadas.

Agradecimentos

Ao Serviço de Apoio ao Estudante da UNICAMP (SAE – UNICAMP), FAPESP, CNPq e CAPES pelo financiamento.

¹ Nelson, D. L.; Cox, M. Lehninger. Princípios de Bioquímica: 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

² Kakiyama, Y.; Houry, W.A. The R2TP complex: discovery and functions. *Biochem. Biophys. Acta* 1823: p. 101-107, 2012.